



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	甲第1484号
学位記番号	第1070号
氏名	村田 和大
授与年月日	平成 27 年 3 月 25 日
学位論文の題名	Physical interaction between MPP8 and PRC1 complex and its implication for regulation of spermatogenesis (MPP8 は PRC1 複合体と結合し、精子形成に関与する) Biochemichal and Biophysical Research Communications (accept for publication)
論文審査担当者	主査： 安井 孝周 副査： 近藤 豊，中西 真

論文内容の要旨

DNA のメチル化やヒストンのメチル化といったエピジェネティック修飾は転写を制御することで発生、分化、細胞の運命維持において重要な役割を担っている。

M phase phosphoprotein8(MPP8)は DNA のメチル化やヒストンの修飾を行うタンパク質と結合することが知られている。これらのことから MPP8 がエピジェネティック修飾を介した転写制御に関与していると考えられる。

MPP8 のラットの組織で発現を免疫組織染色によって調べたところ、精巣の特に精母細胞で高発現していることを確認した。さらに、yeast two-hybrid 法、及びヒトの細胞を用いた免疫沈降法により、MPP8 がエピジェネティックな制御機構の中心であるポリコーム複合体の PRC1 の構成因子と結合することが確認された。また、PRC1 複合体は精巣の発生において重要な役割をしていることが知られている。そこで MPP8 の発現を抑制した HeLa 細胞において DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、精原細胞、精母細胞及び精子に特異的に発現している遺伝子の発現が上昇していることが確認された。さらにマウスの ES 細胞で MPP8 の発現を抑制すると中胚葉分化のマーカーである Cdx2 や Brachyury の発現上昇が確認された。

以上の結果から MPP8 は PRC1 複合体と結合し精子の分化や中胚葉の分化に関係する因子の遺伝子抑制に関係していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

【背景】

DNA メチル化やヒストンの化学修飾は DNA の塩基配列によらないエピゲノム情報をコードしており、多細胞生物体における発生・分化等の細胞運命決定に重要な役割を果たしている。エピゲノム情報の多くは遺伝子発現制御を介して、様々な細胞形質を規定する。M phase phosphoprotein 8 (MPP8) は DNA メチル化酵素 Dnmt3a およびヒストン H3 リジン 9 のメチル化酵素 GLP/G9a と結合し、構成的ヘテロクロマチン形成における DNA メチル化とヒストン H3 リジン 9 メチル化との共役を制御する因子の可能性が示唆されている。一方、ポリコム複合体はヒストン H3 リジン 27 のトリメチル化を介して条件的ヘテロクロマチン形成に関わっている。本研究は MPP8 が条件的ヘテロクロマチン形成に関わっている可能性を考え、ポリコム複合体との関連を解析し、ポリコム複合体により細胞分化が制御されていると考えられている精子形成における役割を明らかにするものである。

【方法】

- ① MPP8 特異抗体を用いてラット組織における MPP8 タンパク質の発現を解析した。
- ② 酵母 Two-hybrid 法を用いて MPP8 と結合するタンパク質を検索した。
- ③ MPP8 がいかなる遺伝子の発現制御に関わっているのかを明らかにする目的で、MPP8 発現抑制 HeLa 細胞を用いたアレイ解析を行った。
- ④ MPP8 と PRC1 複合体構成因子との結合を IP-Western 法により解析した。
- ⑤ MPP8 の細胞運命決定における役割を明らかにする目的で、MPP8 発現抑制マウス ES 細胞を用いて胚葉誘導に関わる遺伝子の発現を解析した。

【結果】

MPP8 の組織特異的発現を調べたところ、精巣組織、とりわけ精母細胞において高い発現を認めた。酵母 Two-hybrid 法により MPP8 と結合する因子を探索したところ、PRC1 構成成分である Ring1B と結合することが分かった。またこの結合は IP-Western 法により確認された。PRC1 発現抑制 HeLa 細胞における遺伝子発現変化を解析したところ、精原細胞、精母細胞、および精子に特異的に発現している遺伝子群の発現が増加していた。一方、MPP8 発現抑制マウス ES 細胞を用いた解析から、MPP8 の発現抑制が、中胚葉誘導に関わる Cdx2 や Brachyury の発現を強く促進することが明らかとなった。

【考察】

MPP8 は PRC1 複合体構成成分と結合することにより条件的ヘテロクロマチン形成を制御している可能性が示唆された。PRC1 複合体は、精子形成過程において重要な役割を果たしていることが知られており、実際 MPP8 の発現も精母細胞において高いことを考え合わせると、MPP8 は PRC1 複合体を介して精子形成過程を制御していると考えられた。さらに、PRC1 複合体は中胚葉誘導においても重要な役割を果たしていると考えられており、MPP8 発現抑制が中胚葉誘導を促進することからも、MPP1 と PRC1 複合体との協調作用が発生・分化において重要であると考えられた。

【審査の内容】

主査の安井教授から、精原細胞から精子までの分化にかかる期間について等 10 項目、第一副査の近藤教授から MPP8 自身の発現制御について等 9 項目、第二副査の中西教授からは DNA 損傷に関わるヒストン修飾について等 3 項目の質問があり、これらに対して適切な回答が得られた。従って、学位申請者は学位論文について十分理解しているとともに、細胞生化学に関する知識を有していると考えられた。本研究は、MPP8 が PRC1 複合体と結合しその機能を制御している可能性を世界で初めて報告したもので、哺乳動物の発生・分化を理解する上で非常に意義のある研究といえる。以上をもって本論文の著者は博士（医学）の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 安井 孝周 副査 近藤 豊 中西 真